



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/53, 9/04, C12P 7/26, C12Q 1/26, 1/68</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/04101</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Februar 1997 (06.02.97)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01341</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 990.4 17. Juli 1995 (17.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). FREIVOGEL, Klaus-Wilhelm [DE/DE]; Im Fleckert 10, D-71093 Weil im Schönbuch (DE). WIESNER, Wolfgang [DE/DE]; Klingenstrasse 7, D-70794 Filderstadt (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01341</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 990.4 17. Juli 1995 (17.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). FREIVOGEL, Klaus-Wilhelm [DE/DE]; Im Fleckert 10, D-71093 Weil im Schönbuch (DE). WIESNER, Wolfgang [DE/DE]; Klingenstrasse 7, D-70794 Filderstadt (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01341</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 25 990.4 17. Juli 1995 (17.07.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). FREIVOGEL, Klaus-Wilhelm [DE/DE]; Im Fleckert 10, D-71093 Weil im Schönbuch (DE). WIESNER, Wolfgang [DE/DE]; Klingenstrasse 7, D-70794 Filderstadt (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: CYCLITOL</p> <p>(54) Bezeichnung: CYCLITOL</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 20px;">An enzyme suitable for oxidising cycloalkane polyols and their derivatives is disclosed, as well as a process for producing the enzyme and its use.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 20px;">Die Erfindung betrifft ein Enzym, geeignet zur Oxidation von Cycloalkanpolyolen und Derivaten davon, ein Verfahren zur Herstellung des Enzyms und dessen Verwendung.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

5

10

15

Cyclitol

Die Erfindung betrifft ein Enzym, geeignet zur Oxidation von Cycloalkanpolyolen und Derivaten davon, ein Verfahren zur Herstellung des Enzyms und dessen Verwendung.

Cycloalkanpolyole (Cyclitole) sind natürliche Kohlenhydrate ($C_nH_{2n}O_n$). Sie sind epimere Polyole mit stabilen Cycloalkan-Grundgerüst (Abb.1), von denen einige chirale Struktur haben; bedeutendste Vertreter der Cyclitole sind die 1,2,3,4,5,6-Cyclohexanhexole (Inositole), von denen es 9 Epimere gibt (myo-, scyllo-, epi-, allo-, muco-, cis-, neo-, D- und L-chiro-Inositol). Desweiteren sind als Umwandlungsprodukte der Cyclitole 1,3,4,5,6-Pentahydroxycyclohexanon-2 (Inososen) zu nennen, von denen es auch eine Vielzahl von Epimeren mit und ohne chiraler Natur gibt [z.B. myo-, scyllo-, (+)epi-Inosose, usw. Letztere sind intermediäre Wertprodukte in der biologisch-chemi-

5 schen Epimerisierung der Inositole untereinander. Sie können als Derivate des Cyclohexanons als regenerierbare, CO₂-bilanzneutrale, reaktive bioorganische Synthesebausteine als Alternative zu petrochemischen Produkten dienen.

10 Myo-Inositol ist das am häufigsten auftretende Isomer der Cyclitole. Es ist in allen Lebewesen anzutreffen. Auch die isomeren scyllo-, D- und L-chiro, neo- und muco-Inositole wurden bereits in biologischem Material nachgewiesen. Der größte Teil der vorkommenden Inositole liegt jedoch nicht frei, sondern in derivatisierter Form vor, z.B. Phytin (Inositolhexaphosphat) oder in Phosphoinositiden als Bestandteil
15 aller Zellmembranen. Aus diesen Verhältnissen ergeben sich verschiedene Aspekte ihrer Umwandlung zur Herstellung von Wertprodukten, die Bereiche der Chemie, Biochemie, Biologie, Medizin und Verfahrens- und Bio- prozeßtechnik umfassen.

20 Ketocyclite stellen Wertprodukte als bioorganische Derivate des Cyclohexanons dar: Sie sind außerordentlich vielseitig verwendbare Reagentien. Neben ihrem möglichen Einsatz als Diätetika und Zuckeraustauschstoffe bei Diabetes, Galactosämie und Neuropathien sind sie als reaktive Ausgangsstoffe für die
25 bioorganische Synthese einer Hexuronsäurebiomasse einsetzbar. Zudem kommen sie als chirale Synthesebausteine und Zwischenprodukte für andere reaktive organische Verbindungen, z.B. für Aromaten (Polyhydroxybenzole), Heterozyklen (z.B. annellierten Tetrazole), Cycloalkane und Farbstoffsynthesen (z.B. Trimethinfarbstoffe) aus nachwachsender Kohlenhydratbiomasse in Frage.

35

Von der chemischen Struktur betrachtet, handelt es sich bei der Inosose um ein Derivat des petrochemischen Cyclohexanons. Cyclohexanon ist Ausgangsstoff für großtechnische Synthesen, wie z.B. Nylon, Pharmazeutika, Farbstoffe usw. Die Inososen können daher, wenn sie kostengünstig in großen Mengen zugänglich wären, als Ersatzstoffe von petrochemischen Grundstoffen dienen. Ein Ziel muß deshalb sein, Inososen aus nachwachsenden Rohstoffen in technischem Maßstab auf enzymtechnischem Weg zugänglich zu machen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Enzym bereitzustellen, das Cyclitole und deren Derivate umwandeln kann. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung dieses Enzyms bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden durch ein Enzym gemäß Anspruch 1, eine DNA gemäß Anspruch 6 bzw. durch ein Verfahren gemäß Anspruch 7 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Von den Erfindern wurde gefunden, daß es möglich ist, Cyclitole mittels des erfindungsgemäßen Enzyms unter Verwendung eines Coenzym und Wasserstoffakzeptors zu oxidieren. Der Elektronenakzeptor ist dabei bevorzugt Ubiquinon und Derivate davon. Das erfindungsgemäße Enzym ist ein reaktionsselektiver Proteinkatalysator zur Redoxreaktion an Cyclitolen und Ketocyclitolen.

Das erfindungsgemäße Enzym ist dadurch gekennzeichnet, daß es ein hydrodynamisches Äquivalent der Molekularmasse von etwa 87000 Da aufweist und u.a. folgende Aminosäuresequenz enthält:

4

-F-R-V-H-P-T-I-A-P-Q-N-T-T-H-P-Q-E-

5 Weitere Sequenzabschnitte des erfindungsgemäßen En-
zyms sind:

5

-N-A-K-N-L-Y-S-G-K-V-K-X-S-
 -N-A-I-D-L-R(X) -S(X) -G-K-V-K(X) -
 -K-Q-E-E-A-X-R-S-G-F-K-P-S-S-E-G-E-Y-S-E-Q-K-G-T-P-X-G-
 -R-K-V-P-Q-D-G-A-P-E-H-Q-Y-L-A-P-E-Q-P-Y-S-A-L-X-I-G-T-E-R-L-K-P-S-N-
 -F-F-S-M-A-G-L-M-X-V-K-M-X-Y-G-
 -S-D-K-T-G-K-Q-Y-I-V-V-T-A-G-G-L-T-R-S-G-V-D-K-D-, N-R-G-D, N-Y-V-I-A-Y-L-P-S-E
 -A-I-D, N-K-R-S-X-K-V-R(X) -X-S-M-P-
 -V-P-Q-D-G-A-P-E-H-Q-Y-L-A-P-E-Q-P-Y-S-A-L-
 -F-R-V-H-P-T-I-A-P-Q-D-T-T-H-P-Q-E-T-A-S-X-A(X) -D-S(X) -D-Q-P-G-H-D(X) -
 -K-F-N-P-H-A-Q-T-K-
 -A-S-D-E-Y-N-D-A-F-V-A-V-D-A-K-
 -D-R-G-N-Y-V-I-A-Y-A-L-P-S-E-
 -G-Q-I-F-V-L-D, N-R-R-D, N-G-T-P-I-V-P-V-E-M-R-K-
 -T-G-D-E-R-X-H-F-R-T-A-N-H-D-L-V-D-Y-D-A-T-A-Q-
 -A-T-K-K-Y-P-G-Y-Y-G-G-I-N-X-G-G-A-V-D-E-X-T-G-
 -G-T-P-X-G-V-V-X-S-M-F-F-S-P-A-G-L-P-C-V-K-P-P-Y-G-T-M-N-A-I-D-L-R-S-G-K.

X = unbekannte Aminosäure

5

10

15

20

Es können erfindungsgemäß auch eine oder mehrere Aminosäuren verändert oder deletiert sein.

- 5 Die in den Aminosäuresequenzen aufgezählten Aminosäuren sind im üblichen Einbuchstabencode angegeben.

Die Erfindung betrifft auch folgende DNA-Sequenzen:

7

1

Reverse translated 1-20

V P Q D G A P E H Q Y L A P E Q P Y S A
GTGCCCCAGGATGGGGCCCCTGAGCACCAGTACCTGGCCCCTGAGCAGCCCTACTCTGCC

2

Reverse translated 1-14

N A K N L Y S G K V K X S
AATGCCAAGAACCTGTACTCTGGCAAGGTGAAGNNNTCC

3A

Reverse translated 1-11

N A I D L R S G K V K
AATGCCATTGACCTGCGGTCTGGCAAGGTGAAG

3B

Reverse translated 1-11

N A I D L X X G K V X
AATGCCATTGACCTGNNNNNNGGCAAGGTGNNN

4

Reverse translated 1-27

K Q E E A X R S G F K P S S E G E Y S E
AAGCAGGAGGAGGCCNNNCGGTCTGGCTTCAAGCCCTCCTCTGAGGGGGAGTACTCTGAG

Q K G T P X G
CAGAAGGGCACCCCCNNNGGC

5

Reverse translated 1-34

R K V P Q D G A P E H Q Y L A P E Q P Y
CGGAAGGTGCCCCAGGATGGGGCCCCTGAGCACCAGTACCTGGCCCCTGAGCAGCCCTAC

S A L X I G T E R L K P S N
TCTGCCCTGNNNATTGGCACAGAGCGGCTGAAGCCCTCCAAC

6

Reverse translated 1-15

F F S M A G L M X V K M X Y G
TTCTTCTCCATGGCTGGCCTGATGNNNGTGAAGATGNNNTATGGC

7

Reverse translated 1-38

S D K T G K Q Y I V V T A G G L T R S G
TCTGACAAGACAGGCAAGCAGTACATTGTGGTGACAGCTGGGGGCTGACCCGGTCTGGG

V D K D N R G D N Y V I A Y L P S E
GTGGACAAGGACRACCGGGGGGACAACATGTGATTGCCTACCTGCCCTCTGAG

8A

Reverse translated 1-15

A I D N K R S X K V R X S M P
GCCATTGACAACAAGCGGTCCNNNAAGGTGCGGNNNTCCATGCCC

8B

Reverse translated 1-15

A I D N K R S X K V X X S M P
GCCATTGACAACAAGCGGTCCNNNAAGGTGNNNNNTCCATGCCC

9a

Reverse translated 1-30

F R V H P T I A P Q D T T H P Q E T A S
TTCCGGGTGCACCCACCATTTGCCCCCAGGACACCACCCACCCACCCAGGAGACAGCCTCC

X A D S D Q P G H D
NNNGCTGACTCTGACCAGCCTGGCCATGAC

9b

Reverse translated 1-30

F R V H P T I A P Q D T T H P Q E T A S
TTCCGGGTGCACCCACCATTTGCCCCCAGGACACCACCCACCCACCCAGGAGACAGCCTCC

X X D X D Q P G H X
NNNNNGACNNNGACAGCCTGGCCACNNN

10

Reverse translated 1-9

K F N P H A Q T K
AAGTTCAACCCCATGCCCAGACCAAG

11

Reverse translated 1-15

A S D E Y N D A F V A V D A K
GCCTCTGATGAGTACAATGATGCCTTTGTGGCTGTGGATGCCAAG

12

Reverse translated 1-14

D R G N Y V I A Y A L P S E
GACCGGGGCAACTATGTGATTGCCTATGCCCTGCCCTCTGAG12

13

Reverse translated 1-23

G Q I F V L D N R R D N G T P I V P V E
GGCCAGATCTTTGTGCTGGACAACCGGCGGGACAATGGCACCCCATTTGTGCCTGTGGAG

M R K
ATGCGGAAG

14

Reverse translated 1-23

T G D E R X H F R T A N H D L V D Y D A
ACAGGGGATGAGCGGNNNCACTTCCGGACAGCCAACCATGACCTGGTGGACTATGATGCC

T A Q
ACAGCCCAG

15

Reverse translated 1-24

A T K K Y P G Y Y G G I N X G G G A V D
GCCACCAAGAAGTACCCTGGCTACTATGGGGGCATCAACNNNGGGGGGGGGCTGTGGAT

E X T G
GAGNNNACAGGC

16

Reverse translated 1-36

G T P X G V V X S M F F S P A G L P C V
GGCACCCCNNGGGGTGGTGNNTCCATGTTCTTCTCCCTGCTGGCCTGCCCTGTGTG

K P P Y G T M N A I D L R S G K
AAGCCCCCTATGGCACCATGAATGCCATTGACCTCCGCTCTGGCAAG

17

Reverse translated 1-17

F R V H P T I A P Q N T T H P Q E
TTCCGGGTGCACCCACCATTTGCCCCCAGAACACCACCCACCCCAAGGAG

Erfindungsgemäß kann die DNA auch Unterschiede von einem oder mehreren Basenpaaren aufweisen. Unter die Erfindung fällt auch mit den obigen DNA-Sequenzen hybridisierende DNA oder eine mit der genannten DNA
5 über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Weiter ist das erfindungsgemäße Enzym durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

10

- Oxidation von Cyclitol [Cycloalkanpolyol], insbesondere von Inositol[1,2,3,4,5,6 Cyclohexanhexol, $C_6H_{12}O_6$] und Derivaten davon, in vivo und in vitro unter Benutzung von Ubiquinon-Derivaten
15 als Coenzymtyp und Wasserstoffakzeptor;
- Biokatalyse genannter Reaktionen dadurch, daß Ubiquinon und seine Derivate als Coenzymtypen bevorzugt werden;
- 20 - typische Proteineigenschaften und Proteinreaktionen (Folin- und Biuretreaktionen);
- Schmelzpunkt: etwa 200 °C (Zersetzung unter
25 Luft- und Sauerstoffausschluß);
- hydrodynamisches Äquivalent der Molekularmasse: 87'000 Dalton;
- 30 - das native Protein besteht aus nur einer Peptideinheit (Protomer);
- elektrophoretische Wanderung bei pH 7.40 in Acrylamidmatrizen ist anodisch;

35

- löslich in wäßrigen Medien einschließlich 20 % Ethanol bei einem pH-Wert von 4,0 bis 10,0;
- 5 - es hat einen konstanten Temperaturkoeffizienten der Löslichkeit in Ammoniumsulfatlösungen zwischen -10 °C und +50 °C;
- es ist unlöslich in Chloroform, Benzol, Xylol und anderen apolaren nicht wäßrigen und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln;
- 10 - es denaturiert in Chloroform, Benzol und Xylol; Zerstörung der Konformationsstruktur und der Bioaktivität;
- 15 - es hat ein typisches Proteinabsorptionsspektrum im sichtbaren und ultravioletten Frequenzbereich mit einem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten ϵ 280 nm / ϵ 260 nm = 1,5, ein Maximum bei
- 20 280 nm und ein Minimum bei 252 nm;
- es adsorbiert reversibel an Anionen- und Kationenaustauschern und kann nativ der Volumenverteilungs-Chromatographie unterworfen werden.
- 25

Als Protein ist das Enzym ein Makromolekül und, wie alle biologischen Makromoleküle, ein Polymer. Die kennzeichnende Eigenschaft eines jeden Polymers ist sein Aufbau aus einer Wiederholung von einer einzigen oder mehreren Struktureinheiten, genannt Monomere. Im

30 Falle der Proteine sind die Monomere eine Gruppe von etwa 20 Aminosäuren. Für das Enzym der Erfindung sind diese Aminosäurebausteine oben im einzelnen beschrieben. Diese sind untereinander im Protein durch eine

35 Peptidbindung (R-CO-NH-X) in definierter Zahl und

Reihenfolge (Sequenz) verknüpft. Sie spiegeln sich auch im angegebenen hydrodynamischen Äquivalent der Molekularmasse ("Molekulargewicht") wieder. Da man schon bei der Verknüpfung von nur zwei Aminosäuren aus einem Bausatz von 20 verschiedenen Aminosäuren 400 ($=20^2$) verschiedene Strukturen aufbauen kann, ergibt dies bei z.B. 17 Aminosäuren die extrem große Zahl von $20^{17} = 1,3 \cdot 10^{22}$ verschiedenen Verbindungen. Zum Vergleich sei erwähnt, daß nach dem heutigen Stand der Technik nur etwa 10^4 Enzyme und etwa $5 \cdot 10^4$ Proteine überhaupt bekannt sind. Daraus wird ersichtlich, daß bei weitem noch nicht alle möglichen Proteine bekannt sind. Die Maßgabe der ermittelten oben dargestellten Sequenz der 17 Aminosäuren als Teil des Protomers kennzeichnet das Enzym der Erfindung als eine absolute Neuheit aus einer außerordentlich großen Vielzahl von $1,3 \cdot 10^{22}$ möglichen chemischen Verbindungen mit Proteinnatur. Sie ergibt sich durch nur eine einzige, bestimmte Kombination des für alle Proteine üblichen Aminosäure-Bausatzes aus der extrem großen Zahl von $1,3 \cdot 10^{22}$ möglichen Stoffen.

Dies begründet hinreichend die hier erstmals offengelegten besonderen Stoffeigenschaften des neuen Enzyms der Erfindung. Als gekennzeichnet durch die neue Aminosäure-Sequenz als Unterscheidungsmerkmal von $1,3 \cdot 10^{22}$ anderen möglichen Stoffen mit Proteinnatur wird verständlich, daß der erfindungsgemäße neue Proteinstoff auch die erwähnten neuen besonderen Eigenschaften hat, insbesondere in Form der katalytischen Reaktions- und Stereospezifität. Das Enzym ist deshalb auch frei von anderen biologischen und chemischen Wirkungen, die als Eigenschaften von anderen Proteinstoffen, aufgebaut aus demselben Aminosäure-

Bausatz, bekannt sind. Dies betrifft insbesondere folgende Eigenschaften bzw. Wirkungen:

- 5 - keine Lyasewirkung auf C-C-, C-O-, und C-N-Bindungen;
- keine Ligasewirkung;
- 10 - keine Oxidoreduktasewirkung auf nichtzyklische Alkanale, Ketoalkanale, Ketoalkane, Polyole und Hydroxyalkanale;
- keine Xylit:NAD(P)-(1,2,4)-oxidoreduktaseaktivität (D-Xylose-, D- und L-Xylulose bildend),
15 E.C.1.1.1.21; 1.1.1.09 und 1.1.1.10;
- keine Inosit:Sauerstoffoxidoreduktase-(Inosit-oxygenase-)aktivität, E.C.1.13.99.1;
- 20 - keine L-Gulonat:NAD(P)-(3,6)-oxidoreduktaseaktivität, E.C.1.1.1.45 und 1.1.1.19;
- keine Glucose-6-phosphatcyclase-(L-myo-Inositol-1-phosphatsynthase-) Aktivität, E.C.5.5.1.4;
- 25 - keine Alkyl- und Aryl-Aldehyd:NAD(P)-oxidoreduktaseaktivität, E.C.1.2.1.3, E.1.2.1.5 und 1.2.1.7; keine Aldose-1-epimerase-(Mutarotase)-aktivität, E.C.5.1.3.3; keine Karbonat-hydro-
30 lyase-(Carboanhydrase-)aktivität, E.C.4.2.1.1.

Das Enzym kann neben der erwähnten Aktivitätsbestimmung auch physikalisch-chemisch durch das erfindungsgemäße, mit dem molekular einheitlichen Enzymprotein
35 hergestellte spezifische poly- oder monoklonalen An-

ti-Enzym-Antikörperserum oder dessen Anti-Enzym-
Immunglobulinfraktionen nach den verschiedenen übli-
chen immunchemischen und immunbiologischen Methoden
(z.B. Immunodiffusion, Immunoелеktrophorese, RIA,
5 Elisa, usw.) quantitativ bestimmt werden.

Das Enzym wird in den für Proteine üblichen Formen
anwendungsbereit gehalten; dies sind sterile, konzen-
trierte, gepufferte Lösungen des Enzyms im Bereich
10 von 0,01-10 mg/ml, insbesondere 0,5-10 mg/ml, vor-
zugsweise 5 mg/ml. Als Puffer können alle üblichen
Mischungen im pH-Bereich zwischen 4,5 und 11 verwen-
det werden, insbesondere zwischen 6 und 9; vorzugs-
weise wird ein HEPES-Puffer verwendet, der 5 mM MgCl₂
15 und 0,5 N-Dodecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-propansul-
fonat enthält. Die Temperatur des gelösten, anwen-
dungsbereit gehaltenen erfindungsgemäßen Enzyms kann
zwischen -180 °C und +50 °C sein, insbesondere zwi-
schen -40 °C und +40 °C; vorzugsweise findet eine
20 Langzeitlagerung bei -80 °C statt, und das für den
Verbrauch bestimmte gelöste Enzym wird bei 0 °C ste-
ril gehalten.

Das Enzym bzw. dessen Fragmente kann zu präparativen,
25 synthetischen prozeßtechnischen, immunologischen,
diagnostischen und analytischen, chemischen und bio-
logischen Verfahren in vivo und in vitro verwendet
werden, z.B.

- 30 - als bioorganische Synthesebausteine, insbesonde-
re in der Peptid- und Proteinsynthese;
- als Katalysator zur Synthese von chiralen Keto-
cyclitolepimeren, insbesondere von Inososeepime-

ren, vorzugsweise mit Coenzym Q und Derivaten
als Coenzym;

- 5 - als Antigen, insbesondere zur Antikörperherstellung oder -analyse und zu immunologischen Analysemethoden (RIA, Elisa, u.a.);
- 10 - als Testpackung zur Bestimmung von Cyclitolen, vorzugsweise von Inositolen der myo- und epi-Konfiguration, insbesondere mit Coenzym Q und Derivaten als Coenzym.

Erfindungsgemäßes Enzym

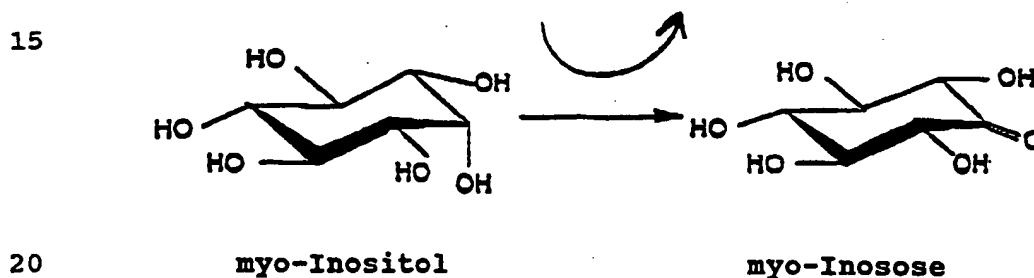


Abb. 1

25 Ein weiterer Anwendungsbereich, in dem das erfindungsgemäße Enzym seinen großen Wert aufweist, ist die analytische Bestimmung von Inositen, insbesondere der myo-, epi- und D-chiro-Konfiguration im pH-Bereich zwischen 4 und 12, insbesondere zwischen pH 6
30 und 8, bevorzugt bei pH 7.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung des Enzyms.

Die Gewinnung des Enzyms ist dadurch gekennzeichnet, daß man es aus Zellen, Geweben und deren Kulturen und Kulturüberstände nach Abtrennung von anderen Proteinen und Substanzen in molekular einheitlicher, kristallisierbarer und biologisch selektiv wirkender und auch in biologisch inaktiver (denaturierter) Form erhalten kann, insbesondere dadurch, daß man Kulturen von Prokaryoten und Eukaryonten, insbesondere Kulturen von *Gluconobacter Oxidans*, als Ausgangsmaterial verwendet; bevorzugt dadurch, daß man genbiologische Rekombinanten, deren Kulturen und Kulturüberstände als Ausgangsmaterial verwendet, welche eine natürliche, chemisch, synthetisierte oder molekularbiologisch oder aus natürlichen und anderen Zellen, Organellen und Geweben, deren Kulturen und Kulturüberständen isolierte Oligonucleotidsequenz mit mindestens $6 \cdot 3 = 18$ Basen oder Teilen und homologen Sequenzen davon enthalten, die die nach Anspruch 1 gegebene Aminosäureteilsequenzen codiert. Die Gewinnung des Enzyms kann auch durch chemische Proteinsynthese der nach Anspruch 1 gegebenen Aminosäure-Teilsequenzen oder Teilen und homologen Sequenzen davon geschehen. Die Gewinnung des Enzyms ist auch möglich durch chemische oder biologische Synthese der Oligonucleotid- oder Antisensenucleotid-Sequenzen in vivo und in vitro, welche die nach Anspruch 1 oder 5 gegebenen Aminosäure-Teilsequenzen codieren, mit mindestens $6 \cdot 3 = 18$ Basen (oder Teilen und homologen Sequenzen davon) und Anwendung dieser Strukturen durch in-vitro- oder in-vivo-Methoden, insbesondere durch die Polymerase-Kettenreaktion ("PCR, Polymerase Chain Reaction") und/oder die Antisense-Bioprozeßtechnik. Die Gewinnung des Enzyms ist weiter dadurch möglich, daß es durch Chromatographie-, Adsorptions- und/oder Aus-salzfraktionierungsmethoden aus den oben genannten

Quellen isoliert wird, insbesondere durch einzelne oder als Folge von Chromatographien an hydrophoben Phasen, Ionenaustauschern, Molekularsieben, Hydroxylapatit und/oder an immunoadsorptiven Matrizen mit Affinität zu der nach Anspruch 1 oder 5 gegebenen Aminosäure-Teilsequenz oder der sie codierenden Oligonucleotid-Sequenz oder Teilen und homologen Sequenzen davon.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren wird das Enzym aus Zellen, Geweben, deren Kulturen oder Kulturüberstandslösungen erhalten, nachdem es von anderen Begleitproteinen abgetrennt wurde. Als Zellen kommen Pro- und Eukaryonten in Betracht.

15 Besonders Zellen und Kulturen und Kulturüberstände von Essigsäurebakterien, vorzugsweise von Gluconobacter oxidans, eignen sich als natürliche Enzymquelle. Sie enthalten das Enzym nicht nur in hinreichender Menge, sondern es kann auch daraus relativ einfach von den vielen verschiedenen Begleitproteinstoffen und Begleitenzymen abgetrennt und in molekular einheitlichem, kristallisierbarem, anwendungsbereitem Zustand isoliert werden.

25 Allgemein bestehen Reinigungsverfahren für Eiweißkörper (Proteine) und andere Naturstoffe aus einer Sequenz kombinierter Trennungsverfahren, welche Molekülgrößen-, Ladungs-, Form-, Affinitäts-, Strukturstabilitäts- und Moleküloberflächen-Beschaffenheitsunterschiede zwischen dem Naturstoff und den begleitenden Fremdstoffen zur Trennung ausnutzen. Dementsprechend können zahlreiche Kombinationen verschiedenster Trennungsverfahren zur Reinigung eines Proteins erarbeitet werden. Für die Handhabungseigen-

30

35

schaften, technische Ausführbarkeit, Automatisierbarkeit und Wirtschaftlichkeit eines Reinigungsverfahrens sowie für die Qualität des gesuchten Naturproduktes ist deshalb nicht allein die Art der verwendeten Trennungsschritte von Bedeutung, sondern insbesondere deren optimierte Gestaltung und deren sinnvolle Kombination in einer Reinigungssequenz innerhalb des Rahmens der Strukturstabilität und der anderen Strukturparameter des gesuchten Stoffes. Das heißt auch, daß selbst die Benutzung gleicher oder ähnlicher Trennungsprinzipien (z.B. Molekularsiebfiltration, Dialyse, Ionenaustauschadsorptionen usw.), aber in unterschiedlicher Kombination, für die Handhabungsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit des Reinigungsverfahrens entscheidend sein können. In bestimmten Fällen ist die Benutzung oder Unterlassung einer einzigen Technik an einer bestimmten Stelle der Reinigungssequenz oder innerhalb einer begrenzten Teilsequenz von ausschlaggebender Bedeutung für die Qualität des gesuchten Naturproduktes sowie für die Handhabungsfähigkeit und die Wirtschaftlichkeit seines Reinigungsverfahrens. Klar aufgezeigt werden diese allgemeinen Zusammenhänge und Grundprinzipien der Naturstoffreinigung beispielsweise an der allgemein bekannten Tatsache, daß in einen wirtschaftlich vernünftigen und technisch handhabungsfähigen Naturstoff-Reinigungsverfahren ein Dialyse-Ultrafiltrations- oder Lyophilisierungsschritt nicht sinnvoll ist, bevor das Gesamtausgangsvolumen oder die Ausgangskonzentration der begleitenden Fremdbestandteile des Naturstoff-Rohextraktes nicht auf mindestens 1/500 bis 1/1000 durch andere Verfahrensschritte reduziert wurde.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Gewinnung des Enzyms in seiner nativen enzymatisch aktiven Form.

- 5 Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Gewinnung wird nachstehend im einzelnen erläutert unter Verwendung von Bakterienkulturen von *Gluconobacter oxidans* als Enzymquelle.

10 **Beispiele**

Allgemeines:

- 15 Alle Arbeiten werden in der Kälte bei 4 °C ausgeführt. Die pH-Werte der Puffer werden bei Raumtemperatur eingestellt.

1. Schritt: Kultur von Mikroorganismen

- 20 Es wurde das Bakterium *Gluconobacter oxidans* DSM 50049 verwendet. Als Kulturmedium diente dazu eine Lösung von 5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l Sorbitol und 30 g/l myo-Inositol. Es wurden Vorkulturen von 50 ml mit der Impföse angeimpft und 2 Tage bei 30°C in 100 ml
25 Schikanekolben bei 120 Upm im Dunkeln gezüchtet. Anschließend wurden die Hauptkulturen von 500 ml mit je 5 ml Vorkultur angeimpft und nach dreitägigem Schütteln bei 110 Upm in 1-l-Schikanekolben durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden noch zweimal mit
30 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und ausgewogen. Sie wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

- 35 Die Enzymbildung wurde in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht. Dazu wurden nach Animpfung einer

Hauptkultur in täglichem Abstand Proben von 5 ml steril entnommen und eingefroren. Nach Beendigung des Versuchs wurden alle Proben gleichzeitig aufgetaut.

- 5 Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine kleine Probe 1 : 10 mit Phosphatpuffer (4 mM, pH 7) verdünnt und die Absorption bei 600 nm gemessen.

- 10 Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert (30 min, 2000 g), mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen und in 0,5 ml Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde ohne Aufschluß direkt mit dem Standardaktivitätstest auf Enzymaktivität untersucht.

15 **2. Schritt: Zellaufschluß und Membranpräparation**

- 20 Die gewaschenen Zellen werden in 20 mM Phosphatpuffer +2 mM $MgCl_2$, pH 7.0 suspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension dreimal mit der French-Presse aufgeschlossen, mit gleichem Volumen 20 mM Phosphatpuffer +2 mM $MgCl_2$ +1 M NaCl versetzt und die Membranfragmente bei 30000 Upm 60 min abzentrifugiert. Die Membranfragmente wurden nochmals mit 20 mM
- 25 Phosphatpuffer + 2 mM $MgCl_2$ +500 mM NaCl gewaschen, in Phosphatpuffer ohne Kochsalz suspendiert und der Proteingehalt auf etwa 30 mg/ml eingestellt. Die so hergestellte Membranfraktion wurde entweder sofort weiterbenutzt oder bei -80 °C eingefroren.

30

3. Schritt: Solubilisierung

Die Membranpräparation wurde 1:1 mit 20 mM Phosphatpuffer versetzt, so daß der Proteingehalt bei

ca. 15 mg/ml liegt. Die verdünnte Proteinlösung wurde mit n-Octylglucosid (2 % w/v) versetzt, 60 min unter schwachem Schütteln inkubiert und 60 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Der klare rötliche Überstand wurde
5 als solubilisierte Proteinlösung weiterverwendet.

4. Schritt: PEG-Fällung

Das solubilisierte Enzympräparat wurde mit 15 % (w/v) PEG-6000 versetzt, 1 h bei 4 °C inkubiert und an-
10 schließend 30 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der rötlich-braune Niederschlag wurde in 20 mM Tris-HCl-Puffer +2 mM MgCl₂+0,5 % N-Dodecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-propansulfonat, pH 7,6, über Nacht unter schwachem Schütteln gelöst und bei 20000 Upm 30 min zen-
15 trifugiert. Der klare Überstand wurde durch ein 0,22-mm-Filter filtriert und weiterverwendet.

**5. Schritt: Chromatofokussierung an starken
Anionenaustauschern (Mono Q⁺)**

5 Die in Chloridform überführte Anionenaustauschersäule wurde mit folgendem Puffer äquilibriert: 10 mM Tris +10 mM Bis-Tris +10 mM MES +2 mM MgCl₂ +0,5 % N-Dodecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-3-propansulfonat; pH 7,6 (Fokussierpuffer A). Anschließend wurde die aus
10 Schritt 4 erhaltene Proteinlösung auf die Säule aufgetragen, und die nicht absorbierten Proteine wurden mit dem Fokussierpuffer A ausgewaschen. Nun wurde ein Gradient in 6 Säulenvolumen vom Fokussierpuffer A zum
15 Fokussierpuffer B (10 mM Tris +10 mM Bis-Tris +10 mM MES +2 mM MgCl₂ +0,5 % N-Dodecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-propansulfonat; pH 5,7) angelegt. Dabei eluierte das Enzym im Maximum der Proteinverteilungskurve am Ende des Gradienten und wurde dabei etwa 17-fach angereichert.

20

**6. Schritt: Anionenaustauschchromatographie an
Mono Q⁺**

25 Die aus Schritt 5 erhaltene aktive Proteinlösung wurde 1:1 mit 50 mM HEPES-Puffer + 2mM MgCl₂ + 0,5 % Zwittergent 3-12, pH 8.0, versetzt und auf die mit 15 mM HEPES + 2 mM MgCl₂ + 0,5 % N-Dodecyl-N,N-dimethyl-ammonio-3-propansulfonat, pH 7.6, äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nun wurde ein Salzgradient auf 200 mM LiCl in 15 Säulenvolumina angelegt. Dabei eluierte das aktive Enzym in einem sehr
30 breiten Maximum der Proteinverteilungskurve, wobei mehrere Schultern und Maxima auftreten können. Dieses Enzympräparat zeigte in einer SDS-Gelelektrophorese
35 (Gradient 10-15) eine Hauptbande bei ca. 85'000 Dal-

ton. Nach diesem Kriterium war das Enzympräparat als einheitlich anzusehen.

7. Schritt: Aktivitätstests des Enzyms

5

Allgemeines:

Um einen Wirkstoff isolieren und reinigen zu können, ist es erforderlich, seine biologische Aktivität de-
10 tektieren zu können. Im Falle eines Enzyms wird dabei auf direktem oder indirektem Weg das Fortschreiten der enzymkatalysierten Umsetzung der an der Enzymreaktion beteiligten Stoffe (Substrate, Produkte, Coenzyme) erfaßt.

15

Bei den Dehydrogenasen bieten sich hierzu spektroskopische Methoden an. Insbesondere die an der Dehydrogenasereaktion beteiligten Cofaktoren haben in Abhängigkeit von ihrem Redoxzustand unterschiedliche Absorptionsspektren. Deshalb können Dehydrogenasereaktionen direkt durch Messung der UV-Absorption bei
20 definierten Wellenlängen verfolgt werden.

Eine andere Möglichkeit zur Detektion von Dehydrogenasen ist die Kopplung der Redoxäquivalente an weitere Akzeptoren (Farbstoffe). Dabei wird der an der Enzymreaktion beteiligte Cofaktor oxidiert und der Farbstoff reduziert. Durch die Reoxidation des Cofaktors wird dieser durch die Reaktion nicht verbraucht und wird deshalb nur in katalytischen Mengen benötigt. Die Reduktion des Farbstoffes bewirkt eine Änderung des Absorptionsspektrums (Farbumschlag) und kann somit durch Messung der Absorptionsänderung bei
30 definierten Wellenlängen quantitativ verfolgt werden.

35

Gleichzeitig bewirkt diese Kopplung, daß das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben wird.

- 5 Bei der untersuchten Inositoldehydrogenase handelt es sich um ein Coenzym-Q-abhängiges Enzym.

Die Inositoldehydrogenase wurde durch einen direkten und mehrere gekoppelte Aktivitätstests charakterisiert.

10

Es wurde die Enzymeinheit Unit (U) verwendet. Eine Enzymeinheit (U) wurde als die Enzymmenge definiert, die ein μmol -Substrat, z.B. Inositol, pro Minute umsetzt. Folglich ergibt sich entsprechend der internationalen Definition (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry, 1973):

15

20
$$1 \text{ U} = 16,6 \cdot 10^{-9} \text{ kat} = 16,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol/s}$$

Der Standardaktivitätstest

5 Der Standard-Aktivitätstest wurde aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit für alle Routinemessungen der Enzymaktivität eingesetzt. Als Standard-Aktivitätstest wurde eine 5-Methylphenaziniummethysulfat(PMSD)-gekoppelte Reduktion von Dichlorphenolindophenol (DCIP) nach dem Stand der Technik verwendet.

10 Um die Enzymaktivität der erfindungsgemäßen Inositoldehydrogenase bestimmen zu können, war es erforderlich, dem Testsystem zusätzlich noch Coenzym Q₂ und Phospholipide zuzusetzen, da diese für die Enzymaktivität notwendigen Substanzen bei der Enzymreinigung
15 abgetrennt werden und ohne diesen Zusatz nach nahezu allen untersuchten chromatographischen Reinigungsschritten nur noch sehr geringe Aktivitätsmengen detektiert werden konnten. Die Reaktion wurde durch
20 Messung der Extinktionsabnahme bei 600 nm photometrisch bei pH 7,0 verfolgt.

Die Berechnung der Enzymaktivität wurde ein Extinktionskoeffizient des DCIP bei pH 7,0 von
25 $\epsilon_{600\text{nm}} = 20,6 \text{ mM}^{-1}$ nach dem Stand der Technik verwendet.

Vorbereitung der phospholipidhaltigen Coenzym-Q₂-Lösung:

30 1 mg Coenzym Q₂ (Decylubiquinon) wurde mit 10 mg Phosphatidylinositol (50 %ig) in wenig Chloroform gelöst, im Vakuum getrocknet und in 0,5 ml 2 %iger wässriger n-Octylglukosid-Lösung im Ultraschallbad
35 dispergiert. Das so dargestellte phospholipidhaltige

Coenzym Q_2 wird im Folgenden PQ_2 genannt. Durch die Pipettierung in den Test wird das Detergens unter die kritische Myzellbildungskonzentration verdünnt, und es entstehen dadurch Coenzym- Q_2 -haltige Liposomen.

5

Im einzelnen wurden zur Ausführung des Standard-Aktivitätstests folgende Lösungen nacheinander in die Küvette pipettiert.

- 10 750 μ l Testpuffer (100 mM MOPS, 5 mM $MgCl_2$; pH 7,0
 4 μ l PQ_2
 2 μ l Enzymlösung
 50 μ l 1,5 mM DCIP-Lösung
 100 μ l 10 mM PMS-Lösung

15

Die Testküvette wurde auf 30°C temperiert, die Reaktion mit 100 μ l 200 mM myo-InositolLösung gestartet und der Extinktionsverlauf 2 min aufgezeichnet.

Patentansprüche

- 5 1. Enzym, geeignet zur Oxidation von Cyclitolen und deren Derivaten,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Enzym ein hydrodynamisches Äquivalent der Molekularmasse von etwa 87000 Da aufweist und folgende Aminosäuresequenz enthält:
- 10 -F-R-V-H-P-T-I-A-P-Q-N-T-T-H-P-Q-E-
- 15 2. Enzym nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß das native Enzym aus nur einer Peptideinheit (Protomer) besteht.
- 20 3. Enzym nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß es einen Schmelzpunkt von etwa 200°C (Zersetzung unter Luft- und Sauerstoffausschluß) aufweist.
- 25 4. Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Cyclitol-Ubiquinon-Oxidoreduktase ist.
5. Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym weiter folgende Sequenzabschnitte aufweist:

-N-A-K-N-L-Y-S-G-K-V-K-X-S-
-N-A-I-D-L-R(X)-S(X)-G-K-V-K(X)-
-K-Q-E-E-A-X-R-S-G-F-K-P-S-S-E-G-E-Y-S-E-Q-K-G-T-P-X-G-
-R-K-V-P-Q-D-G-A-P-E-H-Q-Y-L-A-P-E-Q-P-Y-S-A-L-X-I-G-T-E-R-L-K-P-S-N-
-F-F-S-M-A-G-L-M-X-V-K-M-X-Y-G-
-S-D-K-T-G-K-Q-Y-I-V-V-T-A-G-G-L-T-R-S-G-V-D-K-D,N-R-G-D,N-Y-V-I-A-Y-L-P-S-E
-A-I-D,N-K-R-S-X-K-V-R(X)-X-S-M-P-
-V-P-Q-D-G-A-P-E-H-Q-Y-L-A-P-E-Q-P-Y-S-A-L-
-F-R-V-H-P-T-I-A-P-Q-D-T-T-H-P-Q-E-T-A-S-X-A(X)-D-S(X)-D-Q-P-G-H-D(X)-
-K-F-N-P-H-A-Q-T-K-
-A-S-D-E-Y-N-D-A-F-V-A-V-D-A-K-
-D-R-G-N-Y-V-I-A-Y-A-L-P-S-E-
-G-Q-I-F-V-L-D,N-R-R-D,N-G-T-P-I-V-P-V-E-M-R-K-
-T-G-D-E-R-X-H-F-R-T-A-N-H-D-L-V-D-Y-D-A-T-A-Q-
-A-T-K-K-Y-P-G-Y-Y-G-G-I-N-X-G-G-A-V-D-E-X-T-G-
-G-T-P-X-G-V-V-X-S-M-F-F-S-P-A-G-L-P-C-V-K-P-P-Y-G-T-M-N-A-I-D-L-R-S-G-K-

X = unbekannte Aminosäure

5

10

15

20

6. DNA, kodierend für das Enzym nach Anspruch 1,
wobei die DNA umfaßt:
(a) die folgenden DNA-Sequenzen

30

1

Reverse translated 1-20

V P Q D G A P E H Q Y L A P E Q P Y S A
GTGCCCCAGGATGGGGCCCCTGAGCACCAGTACCTGGCCCCCTGAGCAGCCCTACTCTGCC

2

Reverse translated 1-14

N A K N L Y S G K V K X S
AATGCCAAGAACCTGTACTCTGGCAAGGTGAAGNNNTCC

3A

Reverse translated 1-11

N A I D L R S G K V K
AATGCCATTGACCTGCGGTCTGGCAAGGTGAAG

3B

Reverse translated 1-11

N A I D L X X G K V X
AATGCCATTGACCTGNNNNNNGGCAAGGTGNNN

4

Reverse translated 1-27

K Q E E A X R S G F K P S S E G E Y S E
AAGCAGGAGGAGGCCNNCGGTCTGGCTTCAAGCCCTCCTCTGAGGGGGAGTACTCTGAG

Q K G T P X G
CAGAAGGGCACCCCCNNNGGC

5

Reverse translated 1-34

R K V P Q D G A P E H Q Y L A P E Q P Y
CGGAAGGTGCCCCAGGATGGGGCCCCTGAGCACCAGTACCTGGCCCCCTGAGCAGCCCTAC

S A L X I G T E R L K P S N
TCTGCCCTGNNNATTGGCACAGAGCGGCTGAAGCCCTCCAAC

6

Reverse translated 1-15

F F S M A G L M X V K M X Y G
TTCTTCTCCATGGCTGGCCTGATGNNNGTGAAGATGNNNTATGCC

31

7

Reverse translated 1-38

S D K T G K Q Y I V V T A G G L T R S G
TCTGACAAGACAGGCAAGCAGTACATTGTGGTGACAGCTGGGGGCTGACCCGGTCTGGG

V D K D N R G D N Y V I A Y L P S E
GTGGACAAGGACAACCGGGGGGACAACCTATGTGATTGCCTACCTGCCCTCTGAG

8A

Reverse translated 1-15

A I D N K R S X K V R X S M P
GCCATTGACAACAAGCGGTCCNNNAAGGTGCGGNNNTCCATGCCC

8B

Reverse translated 1-15

A I D N K R S X K V X X S M P
GCCATTGACAACAAGCGGTCCNNNAAGGTGNNNNNTCCATGCCC

9a

Reverse translated 1-30

F R V H P T I A P Q D T T H P Q E T A S
TTCCGGGTGCACCCCACCATTTGCCCCCAGGACACCACCCACCCCCAGGAGACAGCCTCC

X A D S D Q P G H D
NNNGCTGACTCTGACCAGCCTGGCCATGAC

9b

Reverse translated 1-30

F R V H P T I A P Q D T T H P Q E T A S
TTCCGGGTGCACCCCACCATTTGCCCCCAGGACACCACCCACCCCCAGGAGACAGCCTCC

X X D X D Q P G H X
NNNNNGACNNNGACCAGCCTGGCCACNNN

10

Reverse translated 1-9

K F N P H A Q T K
AAGTTCAACCCCATGCCCAGACCAAG

11

Reverse translated 1-15

A S D E Y N D A F V A V D A K
GCCTCTGATGAGTACAATGATGCCTTTGTGGCTGTGGATGCCAAG

32

12

Reverse translated 1-14

D R G N Y V I A Y A L P S E
GACCGGGGCAACTATGTGATTGCCTATGCCCTGCCCTCTGAG12

13

Reverse translated 1-23

G Q I F V L D N R R D N G T P I V P V E
GGCCAGATCTTTGTGCTGGACAACCGGGGGGACAATGGCACCCCCATTGTGCCTGTGGAG

M R K
ATGCGGAAG

14

Reverse translated 1-23

T G D E R X H F R T A N H D L V D Y D A
ACAGGGGATGAGCGGNNNCACTTCCGGACAGCCAACCATGACCTGGTGGACTATGATGCC

T A Q
ACAGCCCAG

15

Reverse translated 1-24

A T K K Y P G Y Y G G I N X G G G A V D
GCCACCAAGAAGTACCCTGGCTACTATGGGGGCATCAACNNNGGGGGGGGGCTGTGGAT

E X T G
GAGNNACAGGC

16

Reverse translated 1-36

G T P X G V V X S M F F S P A G L P C V
GGCACCCCNNGGGGTGGTGNNTCCATGTTCTTCTCCCCTGCTGGCCTGCCCTGTGTG

K P P Y G T M N A I D L R S G K
AAGCCCCCTATGGCACCATGAATGCCATTGACCTGCGGTCTGGCAAG

17

Reverse translated 1-17

F R V H P T I A P Q N T T H P Q E
TTCCGGGTGCACCCCAACATTGCCCCCAGAACACCACCCACCCCAAGGAG

- oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- 5 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
7. Verfahren zur Herstellung des Enzyms nach einem
- 10 der Ansprüche 1 bis 5 durch
- a) Aufarbeitung von Zellen, Geweben, genbiologischen Rekombinanten, deren Kulturen und Kulturüberständen nach Abtrennung von anderen Proteinen oder Substanzen in an sich
- 15 bekannter Weise, oder
- b) chemische Proteinbiosynthese mittels Synthesizer.
8. Verwendung des Enzyms nach einem der Ansprüche 1
- 20 bis 5 als Katalysator zur Analytik und Synthese von Ketocyclitolepimeren, insbesondere von Inososeepimeren, vorzugsweise mit Coenzym Q und Derivaten als Coenzym.
9. Verwendung des Enzyms nach einem der Ansprüche 1
- 25 bis 5 als Antigen, insbesondere zur Antikörperherstellung oder -analyse und zu immunologischen Analysenmethoden (insbesondere RIA, ELISA).
10. Verwendung der Enzmystruktur als cDNA zur Analyse und Synthese entsprechender molekularbiologischer Äquivalenzstrukturen und assoziierter Funktionen.
- 30

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/53, 9/04, C12P 7/26, C12Q 1/26, 1/68, G01N 33/53, C07K 16/40	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/04101 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Februar 1997 (06.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01341 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 25 990.4 17. Juli 1995 (17.07.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). FREIVOGEL, Klaus-Wilhelm [DE/DE]; Im Fleckert 10, D-71093 Weil im Schönbuch (DE). WIESNER, Wolfgang [DE/DE]; Klingenstrasse 7, D-70794 Filderstadt (DE). (74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des Internationalen Recherchen- berichts: 03. April 1997 (03.04.97)	
(54) Title: ENZYME SUITABLE FOR OXIDISING CYCLITOLS AND DERIVATIVES THEREOF (54) Bezeichnung: ENZYM GEEIGNET ZUR OXIDATION VON CYCLITOLEN UND IHREN DERIVATEN (57) Abstract An enzyme suitable for oxidising cycloalkane polyols and their derivatives is disclosed, as well as a process for producing the enzyme and its use. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Enzym, geeignet zur Oxidation von Cycloalkanpolyolen und Derivaten davon, ein Verfahren zur Herstellung des Enzyms und dessen Verwendung.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No
PCT/DE 96/01341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/53 C12N9/04 C12P7/26 C12Q1/26 C12Q1/68 G01N33/53 C07K16/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P C12Q G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FASEB J., vol. 9, no. 6, 24 April 1995, page a1482 (1305) XP002025138 FREIVOGEL AND WISSLER: "Myo-inositol dehydrogenase of the membrane of Gluconobacter oxidans: purification, primary structure, properties and application in bioorganic synthesis." see the whole document ---	1-10
A	DE 41 42 489 A (WISSLER JOSEF H PROF DR RER NA ;CHMIEL HORST (DE)) 24 June 1993 see the whole document, in particular Fig.1 ---	1-10
A	US 4 916 069 A (FUJIWARA AKIKO ET AL) 10 April 1990 see example 1 ---	1-10
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14 February 1997</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05.03.97</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Mandl, B</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01341

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOL. CEL. BIOCHEM., vol. 16, no. 1, 1977, pages 3-8, XP000644594 CRIDDLE ET AL.: "Myo-inositol dehydrogenase(s) from Acetomonas oxydans." see the whole document ---	1-10
P,X	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, vol. 376, September 1995, page s97 XP000644480 FREIVOGEL AND WISSLER: "Myo-inositol dehydrogenase from the membrane of Gluconobacter oxidans." see the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01341

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-4142489	24-06-93	NONE	
US-A-4916069	10-04-90	EP-A- 0248400 JP-A- 63022185	09-12-87 29-01-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01341

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/53 C12N9/04 C12P7/26 C12Q1/26 C12Q1/68 G01N33/53 C07K16/40		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C12P C12Q G01N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FASEB J., Bd. 9, Nr. 6, 24. April 1995, Seite a1482 (1305) XP002025138 FREIVOGEL AND WISSLER: "Myo-inositol dehydrogenase of the membrane of Gluconobacter oxidans: purification, primary structure, properties and application in bioorganic synthesis." siehe das ganze Dokument ---	1-10
A	DE 41 42 489 A (WISSLER JOSEF H PROF DR RER NA ;CHMIEL HORST (DE)) 24. Juni 1993 siehe das ganze Dokument, besonders Fig. 1 ---	1-10
A	US 4 916 069 A (FUJIWARA AKIKO ET AL) 10. April 1990 siehe Beispiel 1 --- ---	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 14. Februar 1997		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 05.03.97
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Mandl, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01341

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MOL. CEL. BIOCHEM., Bd. 16, Nr. 1, 1977, Seiten 3-8, XP000644594 CRIDDLE ET AL.: "Myo-inositol dehydrogenase(s) from Acetomonas oxydans." siehe das ganze Dokument ---	1-10
P,X	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd. 376, September 1995, Seite s97 XP000644480 FREIVOGEL AND WISSLER: "Myo-inositol dehydrogenase from the membrane of Gluconobacter oxidans." siehe das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen

PCT/DE 96/01341

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-4142489	24-06-93	KEINE	
US-A-4916069	10-04-90	EP-A- 0248400 JP-A- 63022185	09-12-87 29-01-88